Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Versuche über Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Alpha-Liponsäure bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hans Kresse
aus Leipzig

1964

7686

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Versuche über Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Alpha-Liponsäure bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktor-Grades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hans Kresse
aus Leipzig

UNIV. BIBLIOTHEK TÜBINGEN

Dekan: Professor Dr. Dr. E. Fröhlich

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Die vorliegende Dissertation entstand auf Anregung von Herrn Professor Dr. Dr. Weitzel, Direktor des Institutes für Physiologische Chemie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Professor Weitzel für seine vielfältige und Anteil nehmende Betreuung sowie für die Überlassung eines Arbeitsplatzes aufrichtig zu danken.

Dank schulde ich weiterhin der Wissenschaftlichen Rätin, Fräulein Dr. A. Fretzdorff und Fräulein G. Andresen für wesentliche praktische Hinweise bei der Durchführung meiner Versuche.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0021

INHALT

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 7

II. MATERIAL UND METHODEN 11

1. Substanzen 11

2. Chemische Methoden 11

3. Biologische Methoden 13

III. ERGEBNISSE 14

1. Veränderungen des Organgehalts an Liponsäure nach einmaliger peroraler Zufuhr 14

A. Liponsäuregehalt der Leber 14

B. Liponsäuregehalt des Gehirns 18

C. Liponsäuregehalt der Niere 21

D. Liponsäuregehalt des Muskels 23

2. Veränderungen des Organgehalts an Liponsäure nach mehrmaliger peroraler Zufuhr 24

A. Liponsäuregehalt der Leber 25

B. Liponsäuregehalt des Gehirns 25

C. Liponsäuregehalt der Niere 26

D. Liponsäuregehalt des Muskels 26

3. Ausscheidung der Liponsäure mit dem Kot nach peroraler Zufuhr 27

4. Schwefelausscheidung im Urin nach peroraler Zufuhr von Liponsäure 32

IV. DISKUSSION

1. Der Einfluß der Liponsäure auf den Fettstoffwechsel 38

2. Die Bindung der Liponsäure 38

3. Die Verteilung der Liponsäure nach einmaliger Zufuhr 39

4. Die Verteilung der Liponsäure nach mehrmaliger Fütterung 40

5. Der Anteil der nicht resorbierten Liponsäure 41

6. Die Ausscheidung der Liponsäure 41

V. ZUSAMMENFASSUNG 42

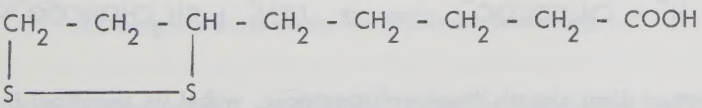
VI. LITERATURVERZEICHNIS 43

VII. LEBENSLAUF 45

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

α-Liponsäure wurde von mehreren Forschergruppen um das Jahr 1950 entdeckt. Erste Versuche, die auf ihre Existenz hinwiesen, wurden von Guirard, Snell und Williams[1] durchgeführt, die bei Milchsäurebakterien einen Faktor fanden, der Azetat ersetzen kann. Dieser "acetate replacing factor" enthält Liponsäure und andere Verbindungen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Butyribacterium rettgeri durch Kline und Barker[2] und bei verschiedenen Pflanzen durch Colio und Babb[3] gefunden. Ein Wachstumsfaktor für Tetrahymena pyriformis, den Stokstad mit seinen Mitarbeitern[4] untersuchte, wurde Protogen genannt. Bei späteren Untersuchungen konnte die Identität von Protogen A mit α-Liponsäure bewiesen werden (Brockman et al.[5]). Als "pyruvat oxydation factor" fanden O'Kane und Gunsalus[6] einen Komplex, der Liponsäure mit ihren Verbindungen enthält und bei Stre. faecalis der Brenztraubensäureoxydation dient. Schließlich konnte Reed mit seinen Mitarbeitern[7] 1951 erstmals aus der Leber eine kristallisierte Verbindung erhalten, die bei Stre. faecalis als Cofaktor der BTS-Oxydation fungierte. Sie wurde α-Liponsäure genannt. β-Liponsäure stellt einen zweiten Wachstumsfaktor dar und ist ihr Sulfoxyd, das mit Protogen B identisch ist (Patterson et al.[8]). Als weitere Bezeichnung bürgerte sich nach der Strukturaufklärung noch der Name Thioctsäure ein, der zur Zeit vorherrschend im amerikanischen Schrifttum ist. In der deutschen Literatur wird der Ausdruck α-Liponsäure am häufigsten verwendet.

Reed und Mitarbeitern[9, 10] und der Lederle-Gruppe[11, 12] glückte etwa gleichzeitig die Strukturaufklärung. α-Liponsäure erwies sich als (+) - 1,2 - dithiolan - 3 - valeriansäure:



Die Struktur konnte durch verschiedene Synthesen bewiesen werden (z.B. von Reed[13, 14], Bullok und Hand[15]).

Die gelben, nadelförmigen Liponsäurekristalle haben einen Fp von 60,5 - 61,5°C. Sie sind außerordentlich gut in organischen Lösungsmitteln löslich. Bei saurer und alkalischer Hydrolyse ist die Liponsäure stabil. Sie polymerisiert sehr leicht, besonders in Gegenwart von Licht oder bei Erwärmung[16]. Hochkonzentrierte Präparate werden schnell durch milde Oxydationsmittel und durch in organischen Lösungsmitteln gebildete Peroxyde oxydiert und ergeben Liponsäuresulfoxyd, d.h. β-Liponsäure.

Bei der Betrachtung der Struktur der Liponsäure fällt auf, daß die Substanz leicht reduziert werden kann und dann in der Dithiolform vorliegt. Die biologische Bedeutung dieses Vorgangs wurde in zahlreichen Experimenten untersucht. Man erkannte, daß die Liponsäure an zentraler Stelle in den intermediären Stoffwechsel eingreift, und zwar erstens bei der oxydativen Dekarboxylierung von α-Keto-Karbonsäuren, insbesondere also von Brenztraubensäure und α-Keto-Glutarsäure, zweitens bei der β-Oxydation von Fettsäuren. Die Dismutation der Brenztraubensäure läßt sich nach diesen Ergebnissen in folgendem Schema darstellen (Zusammenstellung bei Grisebach[17]):

$$CH_3COCOO^- + TPP^+ \longrightarrow (CH_3\ COTPP) + CO_2$$

$$(CH_3COTPP) + LipS_2 + H^+ \longrightarrow CH_3COS\ LipSH + TPP^+$$

$$CH_3COS\ LipSH + CoASH \longrightarrow CH_3COSCoA + Lip(SH)_2$$

$$CH_3COSCoA + HPO_4^{--} \longrightarrow CH_3COOPO_3^{--} + CoASH$$

$$Lip(SH)_2 + DPN^+ \longrightarrow LipS_2 + DPNH + H^+$$

$$DPNH + H^+ + CH_3COCOO^- \longrightarrow DPN^+ + CH_3CHOHCOO^-$$

Die Liponsäure dient also als Wasserstoffüberträger, wobei sie reversibel in die Dithiolform umgewandelt wird.

Leach[18] konnte beweisen, daß sie bei diesem Reaktionsablauf in an Eiweiß gebundener Form vorliegt. Wie es sich aber bei anderen Reaktionen, an denen Liponsäure beteiligt ist, verhält, ist unklar. Lediglich im Modellversuch fand Reed[19], daß Dihydroliponsäure - Transacetylase - und -Dehydrogenase-Reaktionen durch freie Liponsäure vermittelt werden können.

Der Vitamincharakter der Liponsäure ist bislang nur für einige Mikroorganismen erwiesen, beispielsweise für Tetrahymena pyriformis, E. coli, Corynebact. bovis, bestimmte Stre.-lactis-Stämme, nicht aber für Wirbeltiere, insbesondere für den Menschen. Stokstad[20] konnte durch das Fehlen von Liponsäure in der Nahrung und Ausschaltung der Darmbakterien durch Antibiotika keine definierte Mangelkrankheit erzeugen. Außerdem soll der Liponsäuregehalt im Hühnerembryo vom 1. bis zum 21. Tag ansteigen, was ein Beweis für die Synthese im Tierkörper wäre. Andere Autoren[21] bejahen den Vitamincharakter wegen der Rolle der Liponsäure beim Brenztraubensäureabbau und weil somit Liponsäure einen "Antibrenztraubensäurefaktor" darstellt.

In diesem Zusammenhang ist die Frage nach der Resorption peroral zugeführter Liponsäure von Interesse. Rosenberg und Culik[22] berichteten, daß Zugabe von Liponsäure (15 mg/kg) zum Futter von Ratten bestimmte Vitamin-E-Mangelerscheinungen behebt. Patterson und Mitarbeiter[23] fanden bis zu 10% der oral zugeführten Liponsäure im Urin. Auch Liponamid wird bei Menschen und Kaninchen nach oraler Gabe resorbiert[24]. Quantitativ und nach höherer Dosierung wurde aber die Liponsäureresorption unseres Wissens noch nicht untersucht. Genaue Kenntnis über den Resorptionsgrad nach oraler Aufnahme ist auch deshalb von Bedeutung, weil in den letzten Jahren therapeutische Anwendungen für Liponsäure auf Grund ihres Wirkungsmechanismus gefunden wurden. Neben italienischen[25] und japanischen Forschergruppen untersuchte Rausch[26,27] in Deutschland als erster ihre klinische Bedeutung.

Wie BAL (Dimerkaptopropanol) entgiftet die Liponsäure Quecksilber und Arsen als Folge der Existenz von Sulfhydrylgruppen. Bedeutsamer ist die Beeinflussung der experimentellen Leberverfettung, da die Liponsäure den Fetteinbau hemmt[28]. Mit gutem Erfolg werden durch Liponsäure die chronische Hepatitis, die Leberzirrhose und

-verfettung, die Neuropathia diabetica und die Wilsonsche Krankheit günstig beeinflußt[29]. Allgemein verwendet man Liponsäure neuerdings als Leberschutzstoff[30] Da es sich bei den genannten Krankheiten um chronische Prozesse handelt, die eine langdauernde Applikation erfordern, ist es auch deshalb erforderlich, die Resorptionsgeschwindigkeit und den genauen Resorptionsgrad, sowie die Ausscheidungsgeschwindigkeit zu ermitteln.

Die toxische und die letale Dosis sind bekannt. Die toxische beträgt bei Wirbeltieren 50 - 100 mg/kg[31]. Damit hat die Liponsäure eine außerordentlich große Wirkungsbreite, da beim Menschen die therapeutische Tagesdosis bei 0,6 mg/kg liegt. Aus den aufgeführten Ergebnissen ergibt sich die Problemstellung für die vorliegende Arbeit. Uns interessierten folgende ungeklärte Fragen:

1. Wie wird eine einmalige hohe Dosis peroral zugeführter Liponsäure resorbiert? Wie groß ist der Resorptionskoeffizient? In welchen Organen und nach welcher Zeit läßt sie sich dann nachweisen?
2. Liegt die resorbierte Liponsäure in den Geweben in der Lipidfraktion oder im Fettextraktionsrückstand, d.h. an Eiweiß gebunden, vor?
3. Verändert sich unter Liponsäuregaben in den Organen der prozentuale Anteil von Gesamtlipiden und fettfreier Trockenbubstanz?
4. Wie wirkt sich länger dauernde Fütterung der Liponsäure auf den Organgehalt an Liponsäure aus?
5. Wieviel Prozent zugeführter Liponsäure werden nach längerer Zufuhr im Harn ausgeschieden?

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Fragen durch Versuche an Ratten geklärt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Substanzen

Es wurde DL-α-Liponsäure, $C_8H_{14}O_2S_2$, der Firma Merck mit einem Molekulargewicht von 206,33 verwendet, ferner ein synthetisches C_8-, C_{10}-, C_{12}-Triglycerid i-812/III der Firma Imhausen.

2. Chemische Methoden

2.1 Der Nachweis der α-Liponsäure erfolgte auf chemischem Wege. In der Literatur wurden bisher fast ausschließlich mikrobiologische Methoden zum Nachweis der Liponsäure beschrieben. Es sei auf die Zusammenstellung von Stokstad[32] in "Methods of Biochemical Analysis", Volume III verwiesen. Eine von Minoru Nishida[33] veröffentlichte chemische Bestimmungsmethode beruht auf der Reaktion der SH-Gruppen der reduzierten Liponsäure mit Dithizon und ist für die vorliegende Arbeit nicht geeignet, da die Liponsäure hier auch in Organen bestimmt werden muß und die Reaktion durch S-haltige Aminosäuren beeinflußt würde.

Da die Liponsäure eine schwefelreiche Verbindung ist - sie enthält etwa 31% Schwefel - schien es gerechtfertigt, Änderungen ihres Gehaltes in Organen und Körperausscheidungen durch Bestimmen des Gesamtschwefels vor und nach Applikation der Substanz zu erkennen.

2.2 Da der Schwefel als Sulfat bestimmt wird, mußten die zu untersuchenden Stoffe erst verascht werden. Wir wählten dafür das Verfahren, das Schöninger[34] für eine Chloridbestimmung angegeben hat. Dabei wird die Substanz auf aschefreiem Filterpapier, das eine Zunge besitzt, eingewogen. Das zusammengefaltete Papier wird in ein Platinnetz, dessen Ende im Kolbenstopfen eingeschmolzen ist, eingewickelt. In den Schliffkolben wird reiner Sauerstoff eingeleitet, nachdem in ihn 10 ml eines 3:7-Gemisches von Perhydrol und Aqua dest. abgemessen worden sind.

Dann wird das Filterpapier an der Zunge angezündet und der Kolben schnell verschlossen. Nach 30 Minuten haben sich die Verbrennungsgase in dem Peroxyd gelöst.

Zur Erzielung höherer Schwefelmengen wurden stets 2 Einwaagen getrennt verascht und anschließend zur Sulfatbestimmung vereinigt.

Zur Veraschung von Urin wurde 1 ml Harn über einem Föhn auf dem Filterpapier tropfenweise eingetrocknet und das Papier wie vorgeschrieben verascht.

2.3 Die Sulfatbestimmung führten wir mittels Leitfähigkeitstitration, deren methodische Möglichkeiten Jander und Pfundt[35] zusammengestellt haben, durch. Das Verfahren beruht darauf, daß bei Titration mit einer $BaCl_2$-Lösung am Umschlagpunkt die Leitfähigkeit sprunghaft zunimmt, weil kein $BaSO_4$ mehr ausfällt und somit keine Ionen verlorengehen. Wenn man die Leitfähigkeit mit einem geeigneten Gerät - wir verwendeten ein Konduktometer der WTW Göttingen - nach Zugabe von je 0,1 ml einer 0,01 m $BaCl_2$-Lösung mißt, kann man graphisch den Neutralisationspunkt bestimmen. Allerdings ist bei biologischem Material der Umschlag nicht so deutlich zu erkennen wie bei chemisch reinen Substanzen. Beschleunigt wird die Reaktion durch Zugabe von Methanol und durch Beifügen von $BaSO_4$ als Kristallisationskeim, wie es Paulson[36] angegeben hat. Die Methode erfordert relativ geringen apparativen Aufwand und ist nicht sehr zeitraubend. Beachten muß man den Temperaturausgleich vor der Titration. Die Interferenz von Calcium macht sich nach unserer Testung mit reinen Ca- und S-Verbindungen bis zum Verhältnis von 0,5 Äquivalenten Ca zu 1 Äquivalent S nicht bemerkbar (nach Paulson 0,4 : 1). Diese Relation wird in unserem biologischen Material nicht überschritten.

Phosphorhaltige Verbindungen stören nach unseren Versuchen die Schwefelbestimmung erst in einem Verhältnis von 15 Äquivalenten P zu 1 Äquivalent S. Auch diese Relation tritt nicht ein. Phosphor ist somit ohne Einfluß.

Selbstverständlich hat hier das angegebene Verfahren den Nachteil, daß nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob eine eventuelle Schwefelvermehrung auf intakte

Liponsäure oder ihre Umbauprodukte zurückzuführen ist.

2.4 Die Aufarbeitung der Organe zwecks Lipidextraktion erfolgte auf die übliche Weise nach Gey und Schön[37]. Dabei werden die grob zerkleinerten Organe in Aceton mehrere Tage getrocknet, dann pulverförmig zerrieben und je 8 Stunden im Soxhlet mit Äthanol und Diäthyläther extrahiert. Der Acetonextrakt wird abdestilliert, im Vakuum getrocknet und dann in Diäthyläther aufgenommen, die Äthanol- und Ätherextrakte werden nach dem Abdestillieren in Petroläther aufgenommen. Anschließend werden alle drei Fraktionen nach Filtration vereinigt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, und die Fette werden im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz aufbewahrt. In den erhaltenen Gesamtlipiden und dem pulverförmig zerriebenen Extraktionsrückstand wurde dann die S-Bestimmung durchgeführt.

3. Biologische Methoden

3.1 Für alle Tierversuche benutzten wir Albinoratten beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 160 - 190 g. Um den Organgehalt an oral resorbierter Liponsäure festzustellen, erhielten die Tiere mit der Schlundsonde Liponsäure, die in einem C_8-, C_{10}-, C_{12}-Triglycerid suspendiert, bzw. teilweise gelöst worden war. Nach 2 oder mehr Stunden wurden die Tiere durch Nackenschlag betäubt und nach Durchtrennung der Carotiden entblutet. Leber, Nieren und Gehirn wurden herauspräpariert und sofort in Aceton aufbewahrt.

3.2 Um den Gehalt an Liponsäure in den Organen nach längerdauernder Verabfolgung zu ermitteln, wurden die Ratten mehrere Tage hintereinander im Abstand von 24 Stunden wie oben beschrieben gefüttert und 24 Stunden nach der letzten Fütterung getötet.

3.3 Zur Bestimmung der nicht resorbierten Liponsäure im Kot und zur Bestimmung der S-Ausscheidung im Urin wurden Stoffwechselkäfige verwendet, durch die Kot und

Urin getrennt erhalten werden können. Da bei diesen Versuchen eine zweite Probe Liponsäure (Merck) verwendet wurde, die sich im Triglycerid nicht suspendieren ließ, mußten auf 5 ml Öl einige Tropfen absoluter, unvergällter Alkohol zugegeben werden. Zur Bestimmung des Resorptionsquotienten erhielten die Tiere alle 24 Stunden Liponsäure mit der Schlundsonde. Gleichzeitig mit der Fütterung wurden die Käfige gewechselt, der eingesammelte Kot 2 Stunden im Trockenschrank bei 105°C getrocknet und dann im Mörser zerrieben. Das gelang nicht ideal, da sich stets im Kot unverdaute, harte Futterbestandteile befanden.

Ähnlich wurde bei der Uringewinnung zur Bestimmung der Schwefelausscheidung verfahren, nur daß den Tieren noch 3 Stunden vor der Liponsäurefütterung 5 ml isotonischer Salzlösung intraperitonaeal injiziert wurde. Dadurch sollte die Diurese gefördert werden und erreicht werden, daß der Urin, der sich nach dem Käfigwechsel eventuell noch in der Blase befindet, annähernd schwefelfrei ist, da sonst die nachträgliche Ausscheidung zum nächsten Tag zählen würde.

Es erwies sich als unmöglich, den Urin trotz Filtration frei von Futterbestandteilen zu bekommen. Daher erhielten die Ratten ab 4.Tage vor Versuchsbeginn nur einmal für etwa 20 Minuten Futter. Die Dressur glückte meist schon am 2. Tag, die Tiere verkürzten ihre komplizierten Freßgewohnheiten und nahmen ausreichend Futter ein (durchschnittlicher Gewichtsverlust in einer Woche 10 - 20 g). Während des Versuches erhielten die Tiere direkt vor der Liponsäureapplikation ihr Normalfutter.

III. ERGEBNISSE

1. Veränderungen des Organgehaltes an Liponsäure nach einmaliger peroraler Zufuhr

A. Liponsäuregehalt der Leber

Zuerst untersuchten wir die Veränderungen des Gehaltes der Leber an Liponsäure. Ratten, die 12 Stunden kein Futter bekommen hatten, erhielten 100 mg DL - α - Lipon-

säure in 1 ml Triglycerid peroral, die Kontrolltiere entsprechend 1 ml Triglycerid. Zur Untersuchung des Einflusses der Liponsäure auf den Fettstoffwechsel wurde an andere Kontrolltiere kein Öl verfüttert, damit die Normallipidwerte für Tabelle I erhalten werden konnten.

Um die Resorptionsgeschwindigkeit feststellen zu können, wurden die Tiere nach 2,4 bzw. 6 Stunden getötet. Im folgenden werden die Werte der Kontrolle mit K, die Ergebnisse nach 2 Stunden mit A, nach 4 Stunden mit B und nach 6 Stunden mit C bezeichnet.

Einige der nach 4 Stunden herauspräparierten Lebern zeigten leichte Anzeichen von Verfettung.

Tabelle I gibt einen Vergleich zwischen den Gesamtlipidwerten und den Fettextraktionsrückständen der verschiedenen Versuchsgruppen.

Versuchsreihe	K Kontrolle	A nach 2 Std.	B nach 4 Std.	C nach 6 Std.
Lebergewicht	6,15 g	7,71 g	5,93 g	6,47 g
Gesamtlipide	0,426 g	0,471 g	0,512 g	0,461 g
% Gesamtlipide	6,9 %	6,1 %	8,6 %	7,1 %
Extraktionsrückst.	1,532 g	1,357 g	1,182 g	1,313 g
% "	23,3 %	20,9 %	19,9 %	22,2 %

Tabelle I: Verteilung von Gesamtlipiden und Fettextraktionsrückständen verschiedener Versuchsreihen

Aus Tabelle I wird ersichtlich, daß der Lipidgehalt der Leber infolge der Fettfütterung nach 4 Stunden deutlich erhöht ist, während der prozentuale Anteil der Nichtlipide gegenüber der Norm entsprechend abgesunken ist. Die Werte der nach 6 Stunden getöteten Tiere gleichen sich dagegen der Norm wieder an.

Überraschenderweise ergab die Schwefelbestimmung in den Leberlipiden der behandelten Tiere keinen Unterschied gegenüber den Kontrollen, also in jedem Fall 0 % S. Im Extraktionsrückstand dagegen konnte eine Schwefelerhöhung festgestellt werden. Die Werte der einzelnen Versuchsreihen zeigt die Tabelle II.

Versuchs-reihe	Schwefelgehalt in % der Trockensubstanz							
	K Kontrolle		A nach 2 Std.		B nach 4 Std.		C nach 6 Std.	
	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.
1	0	0,91	0	0,99	0	1,31	0	1,40
2	0	0,91	0	0,93	0	1,39	0	1,39
3	0	0,97	0	1,04	0	1,36	0	1,41
4	0	0,89	0	0,91	0	1,41	0	1,40
5	0	0,90	0	0,90	0	1,38	0	1,37
6	0	0,90	0	0,86	0	1,30	0	1,40
7	0	0,83	0	0,83	0	1,34	0	1,41
8	0	0,72	0	1,06	0	1,33	0	1,38
9	0	0,86	0	0,93	0	1,30	0	1,16

Tabelle II: S-Gehalt in den Lipiden und im Extraktionsrückstand der Leber bei verschiedenen Versuchsreihen.

In Übereinstimmung mit der Literatur[38] hat die Kontrollgruppe im Extraktionsrückstand einen mittleren Schwefelgehalt von M_K = 0,88 %. Der entsprechende Mittelwert 2 Stunden nach der Fütterung beträgt M_A = 0,96 % S, nach 4 Stunden M_B = 1,35 % S und nach 6 Stunden M_C = 1,39 % S. Dabei besteht zwischen K und A mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 10 % kein Unterschied. Die 4- und 6-Stunden-Werte ergeben einen hochsignifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Die weitere Erhöhung zwischen den Schwefelgehalten von B und C läßt sich statistisch nicht sichern.

Tabelle III zeigt im Überblick die Fehler- und Signifikanzrechnung der Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen.

Versuchsreihe	K	A	B	C
Mittelwert in % = M	0,88	0,96	1,35	1,39
Mittlerer Fehler der Einzelmessung = f_m	0,083	0,085	0,055	0,061
Mittlerer Fehler des Mittelwertes = F_m	0,019	0,018	0,012	0,011
Relativer Fehler der Einzelmessung = δ	9,4 %	8,9 %	4,1 %	4,4 %
Relativer Fehler des Mittelwertes = Δ	2,2 %	1,9 %	0,9 %	0,8 %
t-Wert in Bezug auf K		1,76	7,19	7,47
FG in Bezug auf K		18	16	16
p-Wert in Bezug auf K		< 0,1	< 0,01	< 0,01

Tabelle III: Fehler- und Signifikanzrechnung der S-Werte im Leberfettextraktionsrückstand

In absoluten Zahlen heißt das, daß sich nach 2 Stunden rund 3,5 mg, nach 4 Stunden rund 18 mg und nach 6 Stunden rund 22 mg Liponsäure in der Leber befinden, die aus der zugeführten Menge resorbiert worden sind. Dabei wird angenommen, daß an der Schwefelvermehrung keine Ab- und Umbauprodukte der Liponsäure beteiligen.

B. Liponsäuregehalt des Gehims

Als nächstes untersuchten wir die Veränderungen des Liponsäuregehaltes im Gehim. Veranlaßt wurde dies durch die Tatsache, daß der Tod nach Liponsäureintoxikation an zerebralen Erscheinungen erfolgt. Außerdem beobachteten wir bei manchen Ratten ein apathisches Verhalten einige Stunden nach der Fütterung.

In analogem Versuchsaufbau erhielten nüchterne Ratten 100 mg Liponsäure peroral zugeführt, die in 1 ml Öl suspendiert war, bzw. die Kontrollen nur 1 ml Öl. Die Organe wurden wieder 2,4 und 6 Stunden später herauspräpariert und entsprechend analysiert.

Tabelle IV zeigt die Verteilung zwischen den Gesamtlipiden und der fettfreien Trockensubstanz bei den verschiedenen Gruppen.

Versuchsreihe	K Kontrolle	A nach 2 Std.	B nach 4 Std.	C nach 6 Std.
Gehirngewicht	1,53 g	1,64 g	1,40 g	1,60 g
Gesamtlipide	0,145 g	0,130 g	0,099 g	0,124 g
% Gesamtlipide	9,5 %	7,9 %	7,1 %	7,75 %
Extraktionsrückst.	0,189 g	0,173 g	0,169 g	0,180 g
% "	11,3 %	10,5 %	10,8 %	11,3 %

Tabelle IV: Verteilung von Gesamtlipiden und Extraktionsrückständen verschiedener Versuchsgruppen.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß sich unter Liponsäureeinfluß die Lipidmengen verringern, obwohl der Verminderung schon nach 2 Stunden auffällig ist. Sonst stehen die Ergebnisse im Einklang mit der Fettschutztheorie, über die später noch berichtet wird. Der Anteil des Fettextraktionsrückstandes verändert sich nicht wesentlich.

In den Gehirnlipiden fanden sich ebenfalls keine erkennbaren Schwefelmengen, dagegen erhöhte sich der prozentuale Schwefelgehalt im fettfreien Anteil 4 und 6 Stunden nach der Fütterung. Eine Aufstellung der Einzelergebnisse findet sich in Tabelle V.

Versuchsreihe	Schwefelgehalt in % der Trockensubstanz							
	K Kontrolle		A nach 2 Std.		B nach 4 Std.		C nach 6 Std.	
	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.
1	0	0,82	0	0,85	0	1,04	0	1,06
2	0	0,81	0	0,84	0	1,06	0	1,17
3	0	0,86	0	0,82	0	0,98	0	1,06
4	0	0,88	0	0,84	0	1,02	0	1,20
5	0	0,88	0	0,83	0	1,05	0	1,20
6	0	0,88					0	0,99

Tabelle V: S-Gehalt in den Lipiden und im Extraktionsrückstand des Gehirns in den verschiedenen Versuchen.

Als Leer- und Vergleichswert errechnet sich für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von M_K = 0,85 % S im Extraktionsrückstand, der in Übereinstimmung mit der Literatur steht. 2 Stunden nach der Liponsäurefütterung ist dieser Wert praktisch nicht verändert. Er beträgt M_A = 0,84 % S. 2 Stunden später ist er deutlich auf M_B = 1,03 % S angestiegen, noch ausgeprägter 6 Stunden nach Versuchsbeginn: M_C = 1,13 % S. Um

den letzten Wert sind die Einzelergebnisse stärker als in den anderen Versuchsreihen gestreut. Der Anstieg des Schwefelgehaltes bei den 4- und 6-Stunden-Werten ist eindeutig signifikant. Die Erhöhung zwischen der B- und C-Reihe ließ sich allerdings nicht sichern.

In Tabelle VI geben wir einen Überblick über die Fehlerbreite und die Signifikanz der beschriebenen Ergebnisse.

Versuchsreihe	K	A	B	C
Mittelwert in % = M	0,85	0,84	1,03	1,13
Mittlerer Fehler der Einzelmessung = f_m	0,039	0,046	0,047	0,081
Mittlerer Fehler des Mittelwertes = F_m	0,010	0,015	0,015	0,025
Relativer Fehler der Einzelmessung = δ	4,6 %	5,5 %	4,6 %	7,2 %
Relativer Fehler des Mittelwertes = Δ	1,2 %	1,7 %	1,5 %	2,2 %
t-Wert in Bezug auf K		0,29	3,47	4,04
FG in Bezug auf K		9	9	10
p-Wert in Bezug auf K		$>0,5$	$<0,01$	$<0,01$

Tabelle VI: Fehler- und Signifikanzrechnung der S-Werte im Gehirnfettextraktionsrückstand.

Im Gehirn befinden sich entsprechend den dargestellten Ergebnissen nach 4 Stunden rund 1,0 mg und nach 6 Stunden etwa 1,6 mg der resorbierten Liponsäure, wenn die S - Vermehrung auf sie umgerechnet wird.

C. Liponsäuregehalt der Niere

Um die weitere Verteilung der Liponsäure festzustellen, untersuchten wir die Veränderungen des Schwefelgehaltes der Niere nach Fütterung der Substanz. Das Organ wurde ferner deshalb gewählt, weil die Schnelligkeit des Antransprotes der Liponsäure zur renalen Ausscheidung festgestellt werden sollte.

Der Versuchsaufbau glich völlig den vorangegangenen. Morphologische Auffälligkeiten fanden sich an keinem der herauspräparierten Organe.

Zunächst geben wir wieder die Verteilung von Gesamtlipiden und Fettextraktionsrückständen bei den verschiedenen Versuchsgruppen in Tabelle VII an.

Versuchsreihe	K	A	B	C
Nierengewicht	1,29 g	1,25 g	1,15 g	1,30 g
Gesamtlipide	0,068 g	0,064 g	0,063 g	0,070 g
% Gesamtlipide	5,3 %	5,1 %	5,5 %	5,4 %
Extraktionsrückst.	0,203 g	0,211 g	0,183 g	0,241 g
% "	16,9 %	16,4 %	15,9 %	18,5 %

Tabelle VII: Verteilung von Gesamtlipiden und fettfreier Trockensubstanz der Niere bei verschiedenen Versuchsreihen.

Aus der Tabelle ergibt sich kein bemerkenswerter Unterschied im Anteil der Gesamtlipide und der fettfreien Trockensubstanz der Niere bei den verschiedenen Versuchsgruppen. Das kann im Zusammenhang mit dem weiter unten dargestellten Ergebnis stehen, daß es im Zeitraum von 6 Stunden kaum zu einer Liponsäurevermehrung in der Niere kommt.

Im Fettextrakt konnte in keiner Gruppe ein meßbarer Schwefelgehalt festgestellt

werden, In der fettfreien Trockensubstanz schwankten die Schwefelwerte zum Teil etwas stärker. In Tabelle VIII bringen wir die Einzelergebnisse.

Versuchs-reihe	Schwefelgehalt in % der Trockensubstanz							
	K Kontrolle		A nach 2 Std.		B nach 4 Std.		C nach 6 Std.	
	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst
1	0	1,12	0	1,06	0	1,11	0	1,04
2	0	0,92	0	1,06	0	1,09	0	1,02
3	0	1,17	0	1,04	0	1,08	0	1,08
4	0	1,00	0	1,01	0	1,03	0	1,04
5	0	0,91	0	1,04	0	1,01	0	1,11
6	0	1,03					0	0,96

Tabelle VIII: S-Gehalt in den Gesamtlipiden und im Extraktionsrückstand der Niere bei verschiedenen Versuchsgruppen.

Die unbehandelten Versuchstiere haben im fettfreien Nierenextrakt einen mittleren Schwefelgehalt von M_K = 1,025 % S. In Versuch A beträgt der entsprechende Wert M_A = 1,04 % S, in Versuch B M_B = 1,06 % S und in Versuch C M_C = 1,05 % S. Alle Unterschiede lassen sich nicht statistisch sichern, wie aus Tabelle IX hervorgeht.

Aus den in der Tabelle dargestellten Werten wird ersichtlich, daß wir in der Niere im Zeitraum bis zu 6 Stunden nach der Fütterung nicht sicher resorbierte Liponsäure nachweisen können.

Versuchsreihe	K	A	B	C
Mittelwert in % = M	1,025	1,04	1,06	1,05
Mittlerer Fehler der Einzelmessung = f_m	0,105	0,077	0,052	0,049
Mittlerer Fehler des Mittelwertes = F_m	0,031	0,024	0,017	0,015
Relativer Fehler der Einzelmessung = δ	10,2 %	7,4 %	4,9 %	4,7 %
Relativer Fehler des Mittelwertes = Δ	3,0 %	2,3 %	1,6 %	1,4 %
t-Wert in Bezug auf K		0,14	0,37	0,28
FG in Bezug auf K		9	9	10
p-Wert in Bezug auf K		$> 0,5$	$> 0,5$	$> 0,5$

Tabelle IX: Signifikanzberechnung der S-Werte im fettfreien Nierentrockenextrakt.

D. Liponsäuregehalt des Muskels

In orientierenden Versuchen analysierten wir Rattenmuskeln nach Zufuhr von 100 mg Liponsäure 4 und 6 Stunden nach der Fütterung. Die Muskeluntersuchung lag nahe, da die Stoffwechselreaktionen, in die Liponsäure eingreift, sich vorzugsweise auch im Muskel abspielen.

Der herauspräparierte Muskel wurde bis zur anschließend erfolgenden Einwaage in der feuchten Kammer aufbewahrt, nach der Einwaage im Filterpapier mehrere Stunden im Trockenschrank getrocknet, dann verascht. 3 Proben des gleichen Muskels wurden zur Schwefelbestimmung vereinigt. Die Kontrollwerte und die einzelnen Versuchswerte schwankten alle um 0,30 % S im Frischpräparat. Eine geringe S-Vermehrung bei den behandelten Tieren dürfte nur schwer zu sichern sein.

Orientierend prüften wir ferner die Dosisabhängigkeit des Schwefelanstiegs. Bei Gabe von 50 mg Liponsäure fanden sich unter gleichen Bedingungen nach 4 Stunden in der Leber M = 1,12 % S, im Gehirn M = 0,99 % S und in der Niere M = 0,99 % S.

Zum Abschluß dieses Teiles sei eine graphische Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse in Abb. 1 gegeben.

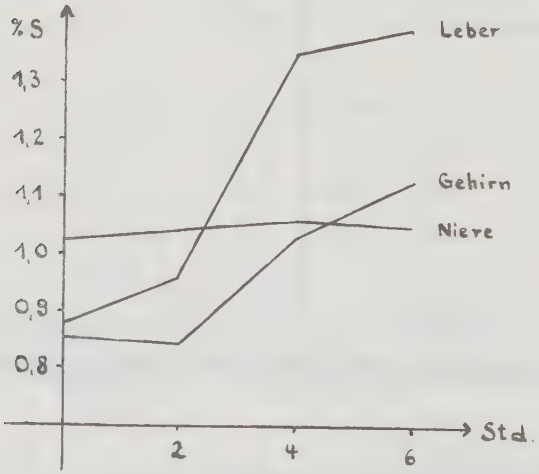


Abb. 1
S-Gehalt im fettfreien Trockenorgan nach Gabe von 100 mg Liponsäure peroral

2. Veränderungen des Organgehaltes an Liponsäure nach mehrmaliger peroraler Zufuhr

Nachdem wir die Veränderungen im Liponsäuregehalt einzelner Organe nach einmaliger Liponsäurezufuhr untersucht haben, sollen nun die gleichen Organe im Hinblick auf die Veränderungen, die nach mehrmaliger Fütterung hoher Dosen Liponsäure entstehen, analysiert werden.

Zu diesem Zweck erhielten die Versuchstiere an 4 aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 24 Stunden 50 mg Liponsäure, in 0,5 ml C_8- C_{10}- C_{12}-Triglycerid suspendiert, mit der Schlundsonde zugeführt. 24 Stunden nach der letzten Fütterung wurden die Tiere getötet und die herauspräparierten Organe analysiert.
Im folgenden soll diese Versuchsreihe mit D bezeichnet werden.

A. Liponsäuregehalt der Leber

Die prozentualen Anteile der Gesamtlipide und der fettfreien Trockensubstanz am Gesamtgewicht der Leber waren gegenüber der Kontrollgruppe nicht deutlich verändert. 7,3 % Gesamtlipid im Fütterungsversuch stehen 6,9 % als Leerwert gegenüber. Der Extraktionsrückstand hatte den gleichen Anteil wie die Kontrolle, nämlich 23,3 %.

Auch nach mehrmaliger Fütterung konnte in den Fetten kein meßbarer Schwefelgehalt ermittelt werden.

Im Extraktionsrückstand betrug der Schwefelgehalt 0,91 % S gegenüber 0,88 % S im Kontrollversuch. Die Veränderung ließ sich nicht statistisch sichern.

Die einzelnen Tierwerte und die Fehlerrechnung bringen wir am Schluß dieses Abschnittes.

B. Liponsäuregehalt des Gehirns

Im Unterschied zur Leber war beim Gehirn der Gesamtlipidanteil am Gehirngewicht mit 7,1 % gegenüber der Kontrolle mit 9,5 % deutlich vermindert und entsprach damit den Werten 4- und 6-Stunden nach der Fütterung. Der Anteil der fettfreien Trockensubstanz blieb mit 11,0 % gegenüber der Norm mit 11,3 % unverändert. Wiederum fand sich in den Lipiden kein meßbarer Schwefelgehalt und damit keine resorbierte Liponsäure.

Im Extraktionsrückstand wurde zwar ein mittlerer Schwefelgehalt von 0,93 % S ermittelt, jedoch ließ sich auch diese Veränderung gegenüber der Norm von 0,85 % S

nicht statistisch sichern, wie aus Tabelle XI hervorgeht.

C. Liponsäuregehalt der Niere

Der Gesamtlipidanteil am Nierengewicht betrug 5,0 % gegenüber 5,3 % bei unbehandelten Tieren. Der Fettextraktionsrückstand machte 15,8 % des Frischgewichtes aus, bei der Kontrolle 16,9 %. Der Lipidgehalt scheint vermindert, jedoch nur in sehr geringem Ausmaß. Bei der Bewertung muß aber auch das zugeführte Öl berücksichtigt werden.

Auch im Nierenfett ließ sich kein Schwefel nachweisen. Im Extraktionsrückstand erreichte der mittlere Schwefelgehalt mit 1,08 % S einen Wert, der im Gegensatz zu den anderen untersuchten Organen höher als 4 und 6 Stunden nach einmaliger Fütterung war. Allerdings ließ sich auch dieses Ergebnis gegenüber dem L-Wert mit 1,025 % S nicht hinreichend statistisch sichern. Dennoch ist die Tendenz zur Steigerung nicht zu übersehen (siehe Tab. XI).

D. Liponsäuregehalt des Muskels

Orientierende Versuche, die wie unter III, 1, D durchgeführt wurden, ergaben keine auffällige Veränderung des S-Gehaltes im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Zum Abschluß dieses Teiles seien in Tabelle X die Einzelergebnisse von den verschiedenen Organen aufgeführt.

Organ	Schwefelgehalt in % der Trockensubstanz					
	Leber		Gehirn		Niere	
	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.	im Lipid	im Rückst.
1	0	0,90	0	0,93	0	1,07
2	0	0,95	0	0,94	0	1,09
3	0	0,90	0	0,89	0	1,07
4	0	0,89	0	0,92	0	1,11

Tabelle X: S-Gehalt von Gesamtlipiden und Extraktionsrückstand von Leber, Gehirn und Niere.

Einen Überblick über Fehlerbreite und Signifikanzrechnung gibt Tabelle XI.

Organ	Leber	Gehirn	Niere
Mittelwert in % = M	0,91	0,93	1,08
Mittl. Fehler Einzelm.	0,033	0,059	0,046
Mittl. Fehler Mittelw.	0,012	0,020	0,017
Relat. Fehler Einzelm.	3,6 %	6,4 %	4,3 %
Relat. Fehler Mittelw.	1,3 %	2,1 %	1,5 %
t-Wert	0,43	1,26	0,56
FG	11	8	8
p-Wert	$> 0,5$	$< 0,5$	$> 0,5$

Tabelle XI: Fehler- und Signifikanzberechnung von Versuch D.

3. Ausscheidung der Liponsäure mit dem Kot nach peroraler Zufuhr

Nachdem festgestellt worden ist, daß beträchtliche Mengen der Liponsäure resorbiert wurden, soll nun der Resorptionskoeffizient der Substanz ermittelt werden. Zu diesem Zweck erhielten die Ratten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen zunächst je 50 mg Liponsäure in 1 ml Triglycerid peroral, und der gesammelte Kot von 24 Stunden wurde auf seinen Schwefelgehalt hin untersucht. Kontrolltiere unter völlig gleichen Versuchsbedingungen erhielten nur 1 ml Öl.

Bei der Durchführung dieser Versuche traten einige Schwierigkeiten auf:

a) 3 von 4 so behandelten Ratten wurden am 4. Tag, also nach dreimaliger Fütterung, tot aufgefunden. Bei makroskopischer Betrachtung der inneren Organe fand sich an pathologischen Veränderungen jeweils nur ein Milzinfarkt. Ein Grund zu dem unterschiedlichen Verhalten gegenüber Versuch D konnte nicht gefunden werden.

Weitere Versuchstiere erhielten dann nur pro die 40 mg oder 30 mg Liponsäure.

b) Als Folge der toxischen Wirkung der Liponsäure sank die Kotmenge stark ab, um nach der letzten Fütterung wieder erheblich anzusteigen. Eine graphische Darstellung der Mittelwerte an den einzelnen Tagen zeigt die Abbildung 2. Die Bedeutung dieser Tatsache ergibt sich daraus, daß die tägliche Futtermenge erheblich schwanken muß, sich aber nicht bestimmen läßt. Nun ist nicht bekannt, wie sich bei geringer Futtermenge und in toxischem Zustand die Ausnutzung der einzelnen Nahrungsbestandteile verhält, insbesondere wie der Nahrungsschwefel resorbiert wird. Um zu einem Ergebnis zu kommen, nahmen wir an, daß eine direkte Proportionalität zwischen Kotmenge, Nahrungsaufnahme und S-Ausnutzung besteht.

c) Bei großen Kotmengen ergeben geringe, in den Fehlerbereich der Methode fallende prozentuale Schwefelgehaltsänderungen schon erhebliche absolute Werte

d) Bei einzelnen Versuchstieren kam es unter Liponsäureeinfluß zu Durchfällen.

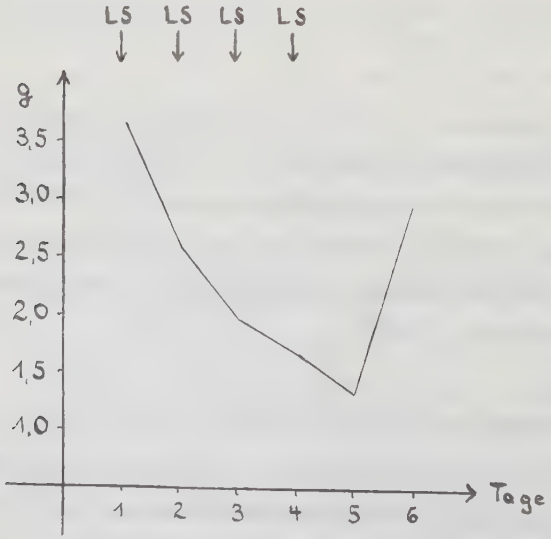


Abb. 2
Kotgewicht nach Liponsäurezufuhr (LS)

Für den Schwefelgehalt des Kotes bei den unbehandelten Tieren ermittelten wir einen Wert von M = 0,46 % S. Der mittlere Fehler der Einzelmessung betrug f_m = 0,044, der des Mittelwertes F_m = 0,008. Das bedeutet einen relativen Fehler der Einzelmessung von δ = 9,4 % und des Mittelwertes von Δ = 1,7 %.

In der folgenden Übersicht werden die Ergebnisse von den einzelnen Versuchstieren dargestellt. Nach der Aufzeichnung des prozentualen Schwefelgehaltes wird aus der Differenz mit dem Leerwert und unter Einbeziehen der Kotmenge der absolute Liponsäureschwefel ausgerechnet. In der nächsten Spalte wird der prozentuale Anteil des ausgeschiedenen Liponsäureschwefels einer Tagesdosis dargestellt. Die Angabe der Gesamtausscheidung des zugeführten Schwefels bezieht sich auf die absolute Summe der gefütterten Tagesdosen.

Tagesdosis	50 mg LS				50 mg LS			
	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	%LS-S
1. Tg.	1,522 g	0,63 %	2,59 mg	16,7 %	2,74 g	0,56 %	2,74 mg	17,6%
2. Tg.	1,594 g	0,80 %	5,50 mg	35,5 %	1,432	0,70 %	3,43 mg	21,8%
3. Tg.	1,338 g	0,74 %	3,68 mg	23,8 %	Exitus			
4. Tg.	1,195 g	0,75 %	3,55 mg	22,8 %				
5. Tg.	3,513 g	0,45 %	-	-				
Aussch. d. LS				24,7 %				19,7%

Tabelle XII: Ausscheidung der Liponsäure im Kot (= LS)

Tages-dosis	40 mg LS				40 mg LS			
	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S
1. Tg.	0,488 g	0,68 %	1,42 mg	11,5 %	2,334 g	0,62 %	3,85 mg	31,0 %
2. Tg.	0,645 g	0,76 %	2,39 mg	19,3 %	1,594 g	0,62 %	2,53 mg	20,4 %
3. Tg.	1,046 g	0,73 %	3,56 mg	28,7 %	1,271 g	0,66 %	2,56 mg	20,6 %
4. Tg.	0,839 g	0,72 %	2,95 mg	23,8 %	1,006 g	0,60 %	1,39 mg	11,2 %
5. Tg.	0,106 g	-	-	-	1,308 g	0,64 %	2,35 mg	20,6 %
Aussch. d. LS				20,8 %				26,0 %

Tabelle XII: Fortsetzung

Tages-dosis	40 mg LS				30 mg LS			
	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S
1. Tg.	0,720 g	0,84 %	2,79 mg	22,5 %	3,179 g	0,54 %	2,54 mg	27,3 %
2. Tg.	0,716 g	0,89 %	3,06 mg	24,7 %	2,979 g	0,58 %	3,50 mg	37,6 %
3. Tg.	0,712 g	0,89 %	3,09 mg	25,0 %	2,417 g	0,59 %	3,30 mg	35,5 %
4. Tg.	0,464 g	1,04 %	2,73 mg	22,0 %	1,890 g	0,58 %	2,18 mg	23,5 %
5. Tg.	0,636 g	0,52 %	0,38 mg	3,1 %	4,004 g	0,43 %	-	-
Aussch. d. LS				24,2 %				31,0 %

Tabelle XII: Fortsetzung

Tages-dosis	50 mg LS				50 mg LS			
	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S	Kotm.	S-Aussch.	LS-S	% LS-S
1. Tg.	3,660 g	0,57 %	3,79 mg	24,2 %	2,354 g	0,59 %	3,18 mg	20,0 %
2. Tg.	2,081 g	0,68 %	4,39 mg	28,3 %	2,130 g	0,59 %	2,77 mg	17,9 %
3. Tg.	Exitus				Exitus			
Aussch. d. LS				26,2 %				19,2 %

Tabelle XII: Fortsetzung

Zusammenfassend ergibt sich aus der Tabelle XII, daß an den einzelnen Tagen folgende Liponsäuremengen in Prozent zu einer Tagesdosis ausgeschieden wurden:

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
Mittelwert in % = M	21,8	25,7	26,7	20,9	8,9
Mittlerer Fehler der Einzelmessung = f_m	6,26	7,47	5,70	5,34	
Mittlerer Fehler des Mittelwertes = F_m	2,21	2,65	2,55	2,39	
Relativer Fehler der Einzelmessung = σ	28,7 %	29,1 %	21,4 %	25,5 %	
Relativer Fehler des Mittelwertes = Δ	10,1 %	10,3 %	9,6 %	11,8 %	

Tabelle XIII: Mittelwerte der täglichen Liponsäureausscheidung im Kot.

Die hohe Fehlerbreite dürfte außer durch die früher aufgeführten Ursachen hauptsächlich dadurch bedingt sein, daß in Einzelfällen die Ausscheidung der zugeführten Liponsäure später als nach 24 Stunden erfolgte, so daß es zu Additionen kam. Dafür liefert die Tabelle XII einige Beispiele.

Aus diesem Grund ist auch der aus den obigen Werten errechnete Resorptionskoeffizient mit einer geringeren Fehlerbreite behaftet. Er beträgt M = 74 %, denn 26,0 % sind nicht resorbiert worden. Dabei beträgt der mittlere Fehler $F_m = 1,6$, was einem relativen Fehler des Mittelwertes von $\Delta = 6,2$ % entspricht. Der mittlere Fehler des Einzelversuches ergibt $f_m = 4,52$ oder $\sigma = 17,4$ %.

Eine graphische Darstellung der prozentualen Liponsäureausscheidung findet sich im nächsten Abschnitt.

4. Die Schwefelausscheidung im Urin nach peroraler Zufuhr von Liponsäure

Als Abschluß der hier darzustellenden Versuche interessierte uns die Ausscheidung des peroral zugeführten Liponsäureschwefels im Urin. Deshalb erhielten die Versuchstiere an 4 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 40 mg Liponsäure in 0,8 ml Öl, die Kontrollen nur 0,8 ml Öl. Der Urin der letzten 24 Stunden vor der ersten Fütterung wurde ebenfalls auf seinen Schwefelgehalt hin untersucht. Die Schwefelbestimmungen im Urin wurden bei den Versuchstieren fortgesetzt, bis sich die Schwefelwerte denen der Kontrolle angeglichen hatten.

Mit der Methode können auch die schwefelhaltigen Abbauprodukte bei der Ausscheidung erfaßt werden.

Als mittleren S-Gehalt des Urins der unbehandelten Ratten ermittelten wir einen Wert von $M = 2,71$ mg S. Der mittlere Fehler der Einzelmessung betrug $f_m = 0,43$ mg, der des Mittelwertes $F_m = 0,088$ mg. Das ergibt einen relativen Fehler der Einzelmessung von $\delta = 15,9\,\%$ und des Mittelwertes von $\Delta = 3,3\,\%$. Es fiel auf, daß die Mittelwerte der einzelnen Versuchstiere z. T. um höhere oder niedrigere Gehalte pendelten, daß also individuelle Faktoren bei der Urinschwefelausscheidung eine Rolle spielen.

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse von einzelnen, mit Liponsäure gefütterten Tieren dargestellt. In der ersten Spalte sind die Absolutwerte aufgezeichnet, in der zweiten die S-Gehalte, die sich nach Abzug des Leerwertes ergeben. Die Summe der Tagesausscheidungen wird dann auf die zugeführte Liponsäuredosis von 160 mg bezogen.

	S-Aussch.	LS-Schwefel	S-Aussch.	LS-Schwefel
1. Tag	2,36 mg	-	3,05 mg	-
2. Tag	8,74 mg	6,53 mg	7,96 mg	4,96 mg
3. Tag	7,12 mg	4,41 mg	10,73 mg	7,73 mg
4. Tag	8,23 mg	5,51 mg	8,81 mg	5,81 mg
5. Tag	7,13 mg	4,42 mg	9,89 mg	6,89 mg
6. Tag	4,19 mg	1,53 mg	3,14 mg	0,14 mg
7. Tag	2,60 mg	-	3,03 mg	-
Summe		22,40 mg		25,53 mg
% des LS-S		45,5 %		51,5 %

Tabelle XIV: Einzelwerte der S-Ausscheidung im Urin

	S-Aussch.	LS-Schwefel	S-Aussch.	LS-Schwefel
1. Tag	2,39 mg	-	3,04 mg	-
2. Tag	7,96 mg	5,25 mg	7,38 mg	4,38 mg
3. Tag	8,34 mg	5,63 mg	9,70 mg	6,70 mg
4. Tag	8,77 mg	6,06 mg	9,80 mg	6,80 mg
5. Tag	7,45 mg	4,74 mg	8,22 mg	5,22 mg
6. Tag	3,68 mg	0,97 mg	3,85 mg	0,85 mg
7. Tag	2,91 mg	-	2,84 mg	-
Summe		22,65 mg		23,95 mg
% des LS-S		45,7 %		48,3 %

Tabelle XIV: Fortsetzung

	S-Aussch.	LS-Schwefel	S-Aussch.	LS-Schwefel
1. Tag	2,68 mg	-	3,03 mg	-
2. Tag	4,69 mg	1,98 mg	7,52 mg	4,52 mg
3. Tag	8,05 mg	5,34 mg	7,31 mg	4,31 mg
4. Tag	7,59 mg	4,88 mg	7,40 mg	4,40 mg
5. Tag	8,82 mg	6,06 mg	8,64 mg	5,64 mg
6. Tag	3,64 mg	0,93 mg	4,73 mg	1,73 mg
7. Tag	2,80 mg	-	3,79 mg	0,79 mg
Summe		19,19 mg		21,39 mg
% des LS-S		39,0 %		43,1 %

Tabelle XIV: Fortsetzung

	S-Aussch.	LS-Schwefel	S-Aussch.	LS-Schwefel
1. Tag	2,83 mg	-	2,32 mg	-
2. Tag	5,63 mg	2,92 mg	3,57 mg	1,24 mg
3. Tag	6,26 mg	3,55 mg	7,54 mg	5,20 mg
4. Tag	7,26 mg	4,55 mg	6,25 mg	3,90 mg
5. Tag	9,52 mg	6,81 mg	9,09 mg	6,76 mg
6. Tag	5,96 mg	3,65 mg	3,70 mg	1,37 mg
7. Tag	2,84 mg	-	2,26 mg	-
Summe		21,48 mg		18,47 mg
% des LS-S		43,3 %		37,3 %

Tabelle XIV: Fortsetzung

Wenn wir die Einzelergebnisse an den einzelnen Tagen zusammenfassen, kommen wir zu folgenden in Tabelle XV dargestellten Schwefelausscheidungen, die sich vom 2. bis 6. Tag signifikant vom Leerwert unterscheiden.

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
Mittelwert = M (mg)	2,71	6,68	8,13	8,01	8,59	4,11	2,88
Mittl. Fehler der Einzelm. = f_m	0,318	1,75	1,46	1,12	0,97	0,88	
Mittl. Fehler des Mittelwertes = F_m	0,113	0,62	0,52	0,40	0,34	0,31	
Relat. Fehler der Einzelmessung = δ	11,7%	26,2%	17,8%	13,8%	11,2%	21,4%	
Relat. Fehler des Mittelwertes = Δ	4,2%	9,3%	6,4%	4,9%	4,0%	7,5%	
t-Wert		3,71	6,57	7,83	9,62	2,45	
p-Wert bei 21 FG		0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	

Tabelle XV: Mittelwerte und Signifikanzrechnung der Urin-S-Ausscheidung

In Abbildung 3 sind die eben geschilderten Ergebnisse graphisch dargestellt.

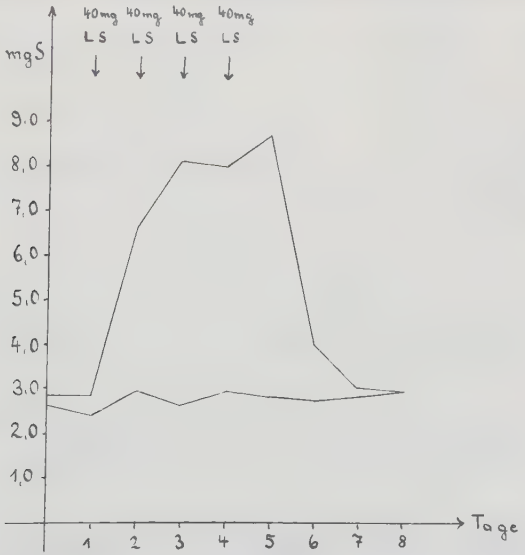


Abb. 3
Mittlere S-Ausscheidung im Urin beim Normaltier und nach Liponsäurezufuhr (LS)

Nach der statistischen Aufarbeitung erkennen wir, daß die größte Streuung um den Mittelwert in den ersten 24 Stunden nach der Fütterung eintritt. In den folgenden Tagen nimmt der absolute Fehler ständig ab. Offensichtlich ist das darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Versuchsratten anfangs ein unterschiedliches Vermögen besitzen, die angebotene Liponsäure auszuscheiden. Erst später stellt sich eine einheitliche Gleichgewichtslage ein. Zwei typische Beispiele stellt Abbildung 4 dar.

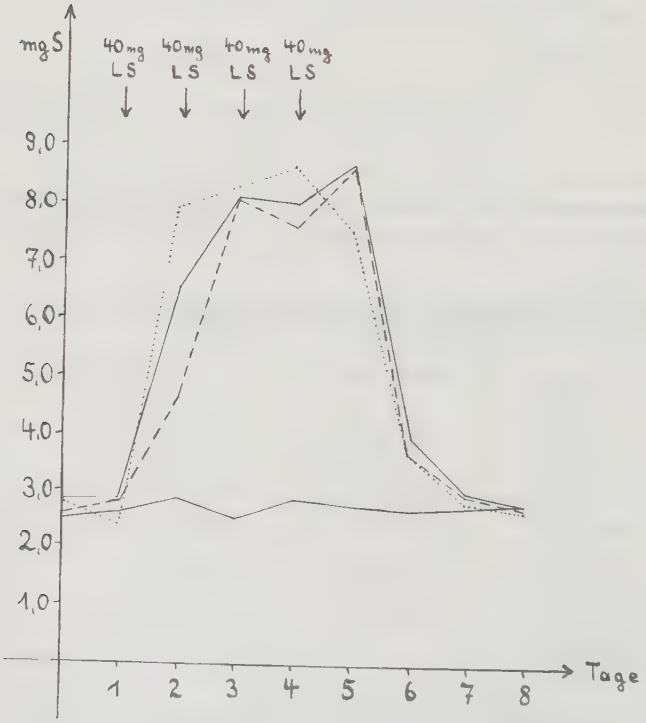


Abb. 4
Beispiele für die Abweichung der S-Ausscheidung im Urin

Einen Beweis dafür, daß der anfänglich hohe Fehler tatsächlich auf einen individuellen Faktor zurückzuführen ist, ergibt sich daraus, daß die Gesamtausscheidung des Schwefels bei den einzelnen Tieren weitaus geringer streut. Wir ermitteln wieder den

prozentualen S-Gehalt im Urin im Verhältnis zur zugeführten Tagesdosis, um den Ausscheidungskoeffizienten zu erhalten. Aus den Einzelwerten errechnet er sich als

$$M = 44,2\ \%.$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessung beträgt $f_m = 4,64$, der des Mittelwertes $F_m = 1,64$. Das bedeutet einen relativen Fehler von $\delta = 10,5\ \%$ bzw. $\Delta = 3,8\%$.

Zum Abschluß wollen wir noch in Abbildung 5 graphisch darstellen, wie sich in Harn und Kot die S-Ausscheidung in Prozent zur Tagesfütterungsmenge verhält und damit demonstrieren, welche Anteile der Liponsäure in den Exkrementen wiedergefunden wurden.

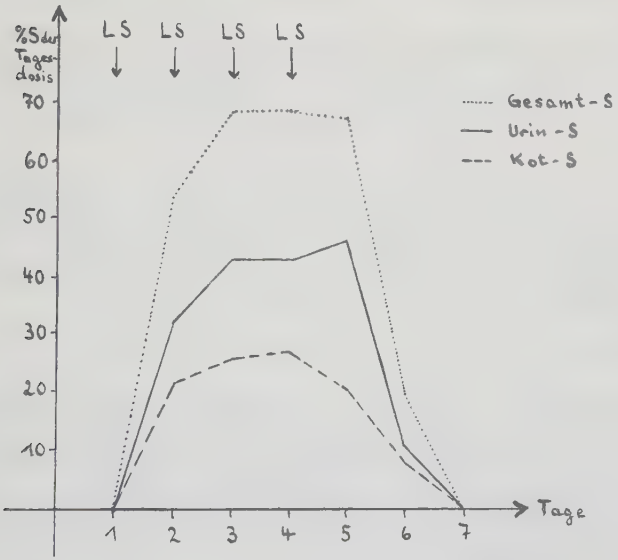


Abb. 5
S-Ausscheidung in Kot und Urin in % zur Tagesdosis

IV. DISKUSSION

1. Der Einfluß der Liponsäure auf den Fettstoffwechsel

Die in Tabelle I und IV dargestellten Befunde lassen uns fragen, ob und durch welche Mechanismen der veränderte prozentuale Lipidanteil am Gesamtgewicht durch die Liponsäure verursacht wird. Trotz längerer Fettzufuhr sind auch in Versuch D die Lipidwerte meist vermindert.

Nach Petzold[28] hemmt die Liponsäure lediglich die Einlagerung von Fett in die Leber, fördert aber nicht den Abtransport, so daß ihr eine Art "Torhüterfunktion" zukäme. Das könnte erklären, warum es in der Leber nur zu einer sehr geringen und im Gehirn zu keiner Lipidvermehrung kommt. Allerdings wird damit nicht gedeutet, warum sie nur so kurzdauernd auftritt, und warum es im Gehirn zur Fettverminderung kommt. Die Ergebnisse von Petzold müssen kritisch gewertet werden, da erstens die gefundenen Lipidwerte extrem niedrig sind und zweitens stark streuen. Unsere Ergebnisse dagegen stimmen mit Befunden von Consolo[39] u. a. überein, die nach Liponsäuregabe eine Verringerung des Grundfettgehaltes und eine Verkürzung der auf orale Fettgaben folgenden Hyperlipämie finden. Gleiches gilt auch für Lipide mit Ausnahme von Cholesterin.

Nach unseren Befunden scheint die Liponsäure also sowohl den Fetteinbau zu hemmen wie den -abbau oder -abtransport zu fördern. Petzold erklärt das erstere mit einer Aktivierung enzymatischer Reaktionen, da er eine Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatase und der Cytochromoxydase findet. Die alkalische Phosphatase soll die Umwandlung von Fett in plasmagängige Lipide fördern. Ein verstärkter Lipidabbau erklärt sich zwanglos aus der Tatsache, daß die Liponsäure über Transazetylierungsreaktionen in den Fettstoffwechsel eingreift (Larizza)[40].

2. Die Bindung der Liponsäure

Die Tatsache, daß keine Liponsäure in der Fettfraktion gefunden wurde, läßt den

Schluß zu, daß die resorbierte Liponsäure restlos an Eiweiß gebunden ist. Reed, Leach und Koike[41] haben die Natur dieser Eiweißbindung untersucht. Da Arsenit, das mit den Sulfhydrylgruppen reagiert, diese Bindung nicht beeinflußte, und da vor der Bindung von Liponsäure an Eiweiß zunächst eine Aktivierung der Carboxylgruppe erfolgt, schlossen sie, daß Liponsäure in ihrer Funktionsform mittels einer vom Carboxyl ausgehenden Bindung an Protein geknüpft ist. Sie liegt dann als "Lipoylenzym" vor. Zur Bindung werden anorganisches Phosphat und ein zweiwertiges Metallion (Mn, Mg, Co oder Zn) benötigt. Es steht fest, daß im Brenztraubensäure-Dehydrogenase-System nur eiweißgebundene Liponsäure wirksam ist. Nach Reed[41] kann das System in ein liponsäurefreies Pyruvat-Dehydrogenase-System, ein Liponsäure-Aktivierungssystem, in ATP und Liponsäure aufgetrennt werden.

Nach unseren Ergebnissen liegt es also nahe, die einleitend erwähnten Reaktionen mit freier Liponsäure tatsächlich nur als Modellreaktionen anzusehen.

Gal und Razewska[42] konnten allerdings nach intraperitonealer Injektion von S^{35}-markierter Liponsäure aus dem Azetontrockenpuder der Lebermitochondrien eine beträchtliche Aktivität gewinnen. Ein erheblicher Teil des Trockenpuders ist in Pentan löslich, so daß das Vorliegen einer Lipidbindung angenommen wird. Dem steht die Behauptung der Autoren gegenüber, der Hauptanteil der Liponsäure des Azetontrockenpuders sei proteingebunden. Der Widerspruch ließe sich nur erklären, wenn durch wasserhaltiges Azeton die Bindung an das Eiweiß zerstört wird, wodurch die Liponsäure in Pentan gelöst werden kann, oder durch die Annahme eines Lipid-Liponsäure-Eiweiß-Komplexes, da aus dem Azetonextrakt Radioaktivität nach Inkubieren in eine BAL-Lösung gewonnen werden konnte, was für eine Verknüpfung mit Lipiden durch Sulfhydrylgruppen sprechen würde.

3. Die Verteilung der Liponsäure nach einmaliger Zufuhr

Interessant ist der Nachweis hoher Liponsäurekonzentrationen schon 4 Stunden nach der Fütterung im Gehirn. Das steht im Gegensatz zu Befunden anderer (Gal)[42]. Sicher ist der hohe Gehalt durch die toxische Dosis, die sich an Hirnerscheinungen

bemerkbar macht, bedingt. Als Zeichen toxischer Schädigung gelten Tonusverlust und allgemeine Apathie. Die beschriebenen konvulsiven Krisen konnten nicht beobachtet werden. Es ist unbekannt, warum es nach hoher Dosis prozentual zu einem größeren Anstieg kommt als nach kleinerer, zumal sich bei Fütterung von 50 und 100 mg Liponsäure eine direkte Dosisabhängigkeit nachweisen ließ. Die Lipoidlöslichkeit der Liponsäure kann nach den vorliegenden Resultaten nicht als Ursache der Anreicherung angenommen werden.

Der Anstieg des Liponsäuregehaltes in der Niere ist wohl deshalb so gering, weil es sofort zur Ausscheidung der dort befindlichen Liponsäure mit dem Urin kommt. Auch die an Hand der Lipidverteilung untersuchte Stoffwechselwirkung der Liponsäure bleibt in der Niere bei einmaliger Fütterung aus und äußert sich nur gering nach mehrmaliger Zufuhr.

4. Die Verteilung der Liponsäure nach mehrmaliger Fütterung

Die nur geringgradige Vermehrung der Liponsäure in den einzelnen Organen deutet auf sehr rasche Ausscheidung.

In der Bilanz wurden aber nur 70 % in Kot und Urin wiedergefunden. Nach Versuch D hat es den Anschein, als ob die Substanz im Körper der Versuchstiere gleichmäßig in allen Geweben verteilt sei. Es ist zu erwägen, ob der Liponsäureschwefel abgebaut wird und ob er zur Synthese von Aminosäuren verwendet oder als Mineral in den Knochen eingebaut wird. Patterson[43] fand ebenfalls keine sichere Vermehrung in zahlreichen Organen, eine fragliche nur in der Leber.

Unklar bleibt, warum es in Einzelfällen zum Exitus kommt, obwohl im Gehirn der Liponsäure-Gehalt geringer ist als nach einmaliger Zufuhr der doppelten Dosis.

5. Der Anteil der nicht resorbierten Liponsäure

Die Problematik der Bestimmung wurde bereits erörtert. In unserem Dosisbereich ist die Resorption direkt von der Zufuhr abhängig. In der Annahme, daß es sich in therapeutischen Bereichen ähnlich verhält, muß bei oraler Gabe gegenüber der i.v.-Injektion 1/3 mehr verabfolgt werden, damit es zur gleichen Wirkung kommt. Wir bezweifeln, ob dann eine orale Dauertherapie mit geringeren Dosen durchgeführt werden kann, wie es Dittrich und Seifert[29] vorschlagen.

6. Die Ausscheidung der Liponsäure

Unser Verfahren, an Hand der S-Ausscheidung Rückschlüsse auf die Liponsäureexkretion zu ziehen, hat den Vorteil, eine Gesamtbilanz aufstellen zu können, in der auch neben intakter Liponsäure die Abbauprodukte und eventuell in Cystinschwefel umgewandelter Liponsäureschwefel (Gal)[42] einbezogen sind.

Die Mitteilungen in der Literatur über die einzelnen Urinkomponenten nach Liponsäureapplikation differieren. Gal und Razewska[42] finden nach intraperitonealer Injektion von S^{35} - markierter Liponsäure über 40 % der Aktivität im 72-Stunden-Urin. Das läßt sich deshalb nicht mit unserem Ergebnis vergleichen, weil sich unser Wert auf die Gesamtzufuhr bezieht. Die Erhöhung dürfte durch die hohe Dosis bedingt sein. 9 % sollen als freie Säuren ausgeschieden werden. - Patterson[23] findet aber als biologisch aktive Form der Liponsäure im Urin nur eine unidentifizierte Form, die gegenüber Alkali stabil und gegenüber Säuren labil ist. Die Aktivität soll durch ihre S-Atome gebunden sein. - Weitere 9 % werden als Sulfat ausgeschieden, 8 % als anorganische SO_4, 1 % als organisches. Bei der Papierchromatographie des Urins wurden 10 Komponenten aufgefunden. Dabei wurden 35 % der Aktivität als gebundene α - Liponsäure identifiziert, 11 % als ihr Sulfoxyd, 5 % als freie Säure. Der Rest blieb unidentifiziert.

Die vermehrte S-Ausscheidung nach einer hohen Einzeldosis ist praktisch nach 2 Tagen beendet, wenn die Tiere auf den Liponsäureabbau eingestellt sind. Es sei noch-

mals auf das anfangs unterschiedliche Abbauvermögen hingewiesen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Resorption, Verteilung und Ausscheidung oral verabreichter α - Liponsäure wurden bei Ratten untersucht.

Die Änderungen des Gehalts an Liponsäure in Organen und Körperausscheidungen wurden indirekt durch Schwefelanalyse vor und nach Applikation der Substanz ermittelt.

In den Gesamtlipiden von Leber, Gehirn und Niere fand sich auch nach hohen Gaben von Liponsäure in keinem Fall ein meßbarer Schwefelwert. Unter Liponsäuregaben sank aber der prozentuale Anteil der Lipide am Gesamtgewicht, bzw. die Dauer der alimentär bedingten Erhöhung des Fettgehaltes war verkürzt. In der fettfreien Trockensubstanz der Leber erhöhte sich der Schwefelgehalt 2, 4 und 6 Stunden nach Applikation von 100 mg Liponsäure um 9, 53 bzw. 58 %. Im Gehirn stieg dabei nach 4 und 6 Stunden der S-Gehalt im Fettextraktionsrückstand um 21 bzw. 33 %. In der Niere konnte bis zu 6 Stunden nach der Fütterung keine signifikante S-Erhöhung ermittelt werden. Nach 4-tägiger Applikation von je 50 mg Liponsäure fand sich 24 Stunden später keine S-Erhöhung in Leber, Gehirn und Niere.
Der Resorptionskoeffizient betrug bei mehrmaliger Fütterung $74,0 \pm 2,0$ %.
Im Urin wurden $44,0 \pm 2,0$ % des zugeführten Schwefels im Laufe von 2 Tagen ausgeschieden.

Die Ergebnisse werden, besonders in Hinblick auf die Wirkform der Liponsäure, diskutiert. Es ist anzunehmen, daß Liponsäure nur in proteingebundener Form biologisch aktiv ist.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Guirard, B.M., E.E. Snell und R.J. Williams, Arch. Biochem. 9, 281, 361 (1946)
2. Kline, L. und H.A. Barker, J. Bacteriol. 60, 394 (1950)
3. Colio, L.G. und V. Babb, J. biol. Chem. 174, 405 (1948)
4. Stokstad, E.L.R., C.E. Hoffmann, M. A. Regan, D. Fordham und T.H. Jukes, Arch. Biochem. 20,75 (1949)
5. Brockman, J.A., E.L.R. Stokstad, E.L. Patterson, J.V. Pierce, M. Macchi und F.P. Day, J. Am. Chem. Soc. 74, 1868 (1952)
6. O'Kane, D.J. und I.C. Gunsalus, J. Bacteriol. 56, 499 (1948)
7. Reed, L.J., B.G. De Busk, I.C. Gunsalus und C.S. Homberger, Science 114, 93 (1951)
8. Patterson, E.L., J.A. Brockman, F.P. Day, J.V. Pierce, M. Macchi, C.E. Hoffmann, C.T.O. Fony, E.L.R. Stokstad, T.H.J. Jukes, J. Am. Chem. Soc. 73,5919 (1951)
9. Reed, L.J., B.G. De Busk, I.C. Gunsalus und G.H.F. Schnakenberg, J. Am. Chem. Soc. 73, 5920 (1951)
10. Reed, L.J., I.C. Gunsalus, G.H.F. Schnakenberg, Q.F. Soper, H.E. Boatz, S.F. Kern und T.V. Parke, J. Am. Chem. Soc. 75, 1267 (1953)
11. Patterson, E.L., J.V. Pierce, E.L.R. Stokstad, C.E. Hoffmann, J.A. Brockman, F.P. Day, M. Macchi und T.H. Jukes, J. Am. Chem. Soc. 76, 1823 (1954)
12. Brockman, J.A., E.L.R. Stokstad, E.L. Patterson, J.V. Pierce und M. Macchi, J. Am. Chem. Soc. 76, 1827 (1954)
13. Homberger, C.S., R.F. Heitmüller, I.C. Gunsalus, G.H.F. Schnakenberg und L.J. Reed, J. Am. Chem. Soc. 75, 1273 (1953)
14. Reed, L.J., Ching-I Niu, J. Am. Chem. Soc. 77, 416 (1955)
15. Bullok, M.W. und J.J. Hand, Chem. Engng. News 33, 1526 (1955)
16. Thomas, R.C., L.J. Reed, J. Am. Chem. Soc. 78, 6148 (1956)
17. Grisebach, H., Angew. Chem. 68 17/18, 554 (1956)
18. Leach, F.R., K. Yasunobu, L.J. Reed, Biochem. Biophys. Acta 18, 297 (1955)
19. Reed, L.J., M. Koike, M.E. Levitch, F.R. Leach, J. Biol. Chem. 232, 143 (1958)

20. Stokstad, E.L.R., H.P. Broquist und E.L. Patterson, Fed. Proc. 12, 430 (1953)

21. Lecoq, M.R., Bull. Acad. méd., 142, 756 (1958)

22. Rosenberg und Culik, Vortrag auf der Tagung der Division of Biological Chemistry of the American Chemical Society, San Francisco, 13.-18.4.58

23. Patterson, E.L., Am. J. of Clin. Nutrition 4, 269 (1956)

24. Jun-Itsu, Saito, Vitamins (Kyoto) 21, 359; zit. nach Chem. Zbl. 1962, 2806

25. Segre, A., Nature 177, 75 (1956)

26. Rausch, F., Kongrzbl. Ges. Inn. Med. 794 (1954)

27. Rausch, F., Arzneimittelforschung 5, 32 (1955)

28. Petzold, H., Acta biol. med. germ. 3, 1 (1959)

29. Dittrich, H. und E. Seifert, Münch. Med. Wschr. 104, 2053 (1962)

30. Ritschel, W.A., Sci. Pharm. (Wien), 29, 3 (1961)

31. Donatelli, L., Int. Thioctsäuresymposium, Neapel (1955), Nature, 177, 75

32. Stokstad, E.L.R., G.R. Seaman, R.J. Davis und S.H. Hutner, Methods of biochem. analysis, Volume III (1956)

33. Nishida, Minoru, Vitamins (Kyoto) 17, 128 (1959) zit. nach Chem. Zbl. 2599 (1960)

34. Schöninger, Mikrochemie ver. Microchim. Acta, 1955, S. 123

35. Jander, G. und O. Pfundt, Die konduktometrische Maßanalyse, Ferdinand - Enke - Verlag 1945

36. Paulson, S., Acta chem. Scand. 7, 325 (1953)

37. Gey, K.F. und H. Schön, Hoppe-Seyler, 305, 149 (1956)

38. Hoppe-Seyler - Thierfelder/Handbuch der physiologisch - und pathologisch-chemischen Analyse V, Springer-Verlag 1953

39. Consolo, F.,
zit. nach Chem. Zbl., 1959, 12616

40. Larizza, P., Int. Thioctsäuresymposium, Neapel (1955)

41. Reed, L.J., F.R. Leach und M. Koike, J. Biol. Chem. 232, 123 (1958)

42. Gal, E. und D. Razewska, Arch. of Biochem. Biophys. 89, 253 (1960)

43. Patterson, E.L., Am. J. of Clin. Nutrition 4, 269 (1956)

VII. LEBENSLAUF

Am 10. Februar 1940 wurde ich in Leipzig als Sohn des Universitätsprofessors Dr. Werner Kresse und seiner Ehefrau Vera geb. List geboren.

Von 1946 bis 1953 besuchte ich in Leipzig die Grund- und Oberschule und bestand im Sommer 1957 die Reifeprüfung.

Vom Herbst-Semester 1957 ab studierte ich an der Universität Leipzig Humanmedizin, bestand im Sommer 1958 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Frühjahr 1960 die Ärztliche Vorprüfung, in beiden Fällen mit der Note "Sehr gut".

Anschließend an mein Physikum wurde ich Hilfsassistent in dem von Prof. Dr. Dr. Strack geleiteten Physiologisch-chemischen Institut der Universität Leipzig und arbeitete auf dem Gebiet der Betaine.

Da meine Eltern im September 1960 mit mir nach der Bundesrepublik flüchteten, endete meine Ausbildung in Leipzig nach dem Frühjahrssemester 1960.

Im Wintersemester 1960/61 studierte ich an der Universität Köln und seit dem Sommersemester 1961 an der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen.

Am 13.12.1963 legte ich hier das Ärztliche Staatsexamen mit der Gesamtnote "Gut" ab.

Im September 1961 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Weitzel, Direktor des Physiologisch-chemischen Institutes der Universität Tübingen, mit der Erarbeitung meiner Dissertation, die ich im Februar 1963 abschloß.

Druck : PAUL JLLG Photo-Offsetdruck, Stuttgart-S, Olgastraße 66a